云 南 植 物 研 究 1991; 13(2): 237—240 ISSN 0253-2700
Acta Botanica Yunnanica CN 53-1039

滇紫草愈伤组织培养的初步研究

周立刚 郑光植 徐 纯
（中国科学院昆明植物研究所，昆明650204）

PRELIMINARY STUDY ON CALLUS CULTURE OF ONOSMA PANICULATUM

ZHOU Li-Gang, ZHENG Guang-Zhi, XU Chun
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica,* Kunming 650204)

关键词 滇紫草；愈伤组织；生长速率；紫草素
Key words *Onosma paniculatum*; Callus; Growth rate; Shikonin

滇紫草（*Onosma paniculatum*）属紫草科滇紫草属植物，其根部皮层富含的紫草素（α-萘醌系列衍生物），可用作治疗外伤与痔疮的药物或高级染料以及化妆品[1]。滇紫草为云南特有，由于人工栽培困难，加之不断采挖，致使这一资源受到严重的破坏，产品供不应求。日本Tabata等对紫草（*Lithospermum erythrorhizon*）的组织培养进行了一系列的研究[1,2,3]，但对滇紫草组织培养以生产紫草素的研究至今未见报道。基于这一现状，我们从1988年开始着手进行滇紫草组织培养的研究，以探讨应用组织培养技术生产紫草素的可能性。

材 料 和 方 法

实验材料 用于诱导愈伤组织的实验材料是云南产的滇紫草。将滇紫草的种子在无菌条件下发芽，选取滇紫草幼苗的根、茎、叶作外植体，用解剖刀将它们切成1.0—1.5cm的截断，接种到事先配好的诱导培养基上。

培养条件 愈伤组织诱导和培养采用LS[4]、MS[5]、B_5[6]、M-9[7]和MG-5[3]培养基。愈伤组织诱导的激素组合为2,4-D 1 ppm和K T1 ppm。愈伤组织培养的激素组合为IAA10^{-6}mol/l和KT10^{-5}mol/l。三角瓶容量为50ml，内装培养基20ml，愈伤组织产量和紫草素产量均以每瓶为单位计算。均置于25°C恒温条件下暗培养，30天继代培养一次。

1990年1月收稿，1990年4月定稿。

愈伤组织中紫草素的初步鉴定 取滇紫草愈伤组织培养物，冰冻干燥后打成细粉，用石油醚提取，水洗石油醚，残渣溶于甲醇，进行TLC层析。展开剂有两个：氯仿：石油醚：醋酸乙酯＝0.5：10：1为展开剂A；氯仿为展开剂B。层析时用标准品（脱氧紫草素、紫草素β-β-二甲基丙烯酯、紫草素乙酯、紫草素β-羟基异戊酯）作对照。

紫草素标准品的制作 取滇紫草生药的根皮，采用Morimoto等方法[8]进行分离得4个单一成分，经TLC、^{13}C NMR、^{1}H NMR、和EI-MS测定，所得数据与文献资料完全一致[8，9]，单体分别鉴定为脱氧紫草素（deoxyshikonin）、紫草素β，β-二甲基丙烯酯（β，β-dimethylacrylshikonin）、紫草素乙酯（acetylshikonin）、紫草素β-羟基异戊酯（β-hydroxyisoverylshikonin）。

愈伤组织中紫草素含量的测定 精密称量紫草素标准品（将各单一成分按一定比例混合而成）样品，用氯仿溶解后，吸取一定量，N_2吹干氯仿，采用比色法测定，测定波长为617.5nm，从而制得标准曲线，相关系数r＝0.9953。愈伤组织样品经冰冻干燥后打成细粉，含量测定同于Mizukami等（1977）[10]。

结 果 与 讨 论

愈伤组织的诱导 为了获得较好部位的愈伤组织，采用了MS、LS和B5三种培养基分别从幼苗的根、茎和叶诱导出了愈伤组织（结果见表1）。诱导根、茎、叶愈伤组织均以LS培养基最佳。愈伤组织的诱导频率和速率在同一种培养基中，以叶外植体最高最快，生长也最好，其次是茎外植体。根、茎、叶外植体的生长情形大体相似。愈伤组织形成初期生长缓慢，大多呈坚硬的块状，有的分化出不定根，挑取生长迅速、疏松的白色愈伤组织块进行继代培养，以后生长逐渐加快。白色的愈伤组织块中有红色的愈伤组织镶嵌分布，这为今后采用目视法筛选高色素含量的愈伤组织株系奠定了基础。在培养过程中发现，红色和白色的愈伤组织能够相互转化。

表1 不同培养基对滇紫草愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different media on inducing callus of *O. paniculatum*

	茎外植体			根外植体			叶外植体		
培养基	发生天数	诱导率（%）	生长	发生天数	诱导率（%）	生长	发生天数	诱导率（%）	生长
MS	14	87.5	＋＋	18	75.0	＋	10	92.5	＋＋
LS	15	92.5	＋＋	18	80.0	＋	10	95.0	＋＋＋
B5	17	75.5	＋	20	65.0	－	12	80.0	＋

愈伤组织的初步培养 开始获得的愈伤组织生长缓慢，质地坚硬，经过5—6代的继代培养以后，愈伤组织已驯化而变得均一。为了使愈伤组织生长更好或含量更高，进行了愈伤组织培养的初步研究。我们采用了M-9、LS、MS、MG-5和B5五种培养基，激素组合为IAA10^{-6}mol/l和KT10^{-5}mol/l，培养时间40天，接种量为112.96mg/瓶，结果列于表2。从表2可以看出，M-9培养基生产色素的能力最强，肉眼明显可见，色

素含量为1.4034%，色素产量为2.9472mg/瓶；愈伤组织的生长以LS培养基最佳，愈伤组织产量为316mgdw/瓶，但其色素含量（0.040%）和产量（0.1264mg/瓶）均处于最低，愈伤组织呈白色。故选用了LS培养基为愈伤组织生长的培养基，M-9培养基为生产紫草素的培养基，这样就初步建立了两步法培养愈伤组织以生产紫草素的基础。

表2　滇紫草愈伤组织培养的培养基选择

Table 2 Selecting of medium on callus culture of *O. paniculatum*

培养基	愈伤组织产量 (mg/flask)	生长速率 (mg/d.fladk)	紫草素含量 (%)	紫草素产量 (mg/flask)
M-9	210	2.426	1.4034	2.9472
LS	316	5.076	0.0400	0.1264
MS	208	2.376	0.0522	0.1086
MG-5	214	2.526	0.1626	0.3480
B5	252	3.476	0.2164	0.5454

紫草素的初步鉴定　在M-9培养基上生长的滇紫草愈伤组织，经冰冻干燥后用石油醚提取紫草宁，进行TLC层析（结果见图1）。从层析结果看，诱导出来的愈伤组织和原植物一样同样具有合成次级代谢物紫草素的能力，这是对"培养细胞全能性"的观点[11]的又一证据。从TLC层析中还能看出，培养的愈伤组织生产紫草素乙酯（acetylshikonin）的能力特别强。

通过以上研究，确立了滇紫草细胞色素工程的研究以其幼苗的叶愈伤组织体系为对象，以LS培养基为愈伤组织生长培养基，以M-9培养基为愈伤组织生产色素的培养基。愈伤组织能象原植物一样能迅速地生产紫草素。

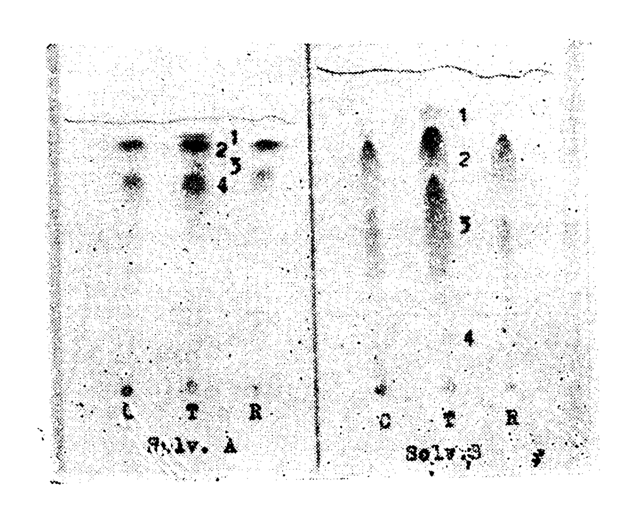


图1　滇紫草愈伤组织和原植物根的紫草素薄层层析比较

Solv.A.氯仿：石油醚：醋酸乙酯=0.5：10：1；Solv.B.氯仿；C：愈伤组织 T：标准紫草素（1.脱氧紫草素；2.紫草素β-β-二甲基丙烯酯；3.紫草素乙酯；4.紫草素β-羟基异戊酯）；R：根

Fig 1 The shikonin pigments comparision of TLC between the calluses and

root bark of the original plant

Solv A Chloroform : Petroleum benzine : AcoEt = 0.5 : 10 : 1; Solv. B. Chloroform; C: Callus; T: Standard Shikonin pigments(1.deoxyshikonin; 2.β,β-dimethylacrylshikonin; 3.acetylshikonin; 4.β-hydroxyisovelerylshikonin); R: Root

致谢 我所庄璇副研究员鉴定滇紫草标本。

参 考 文 献

1 Fujita Y, Tabata M. Plant tissue and cell culture. New York: Alan R. Liss, Inc, 1987: 167—185

2 Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N et al. *Phytochemistry* 1974; 13(6): 927—932

3 Fujita Y, Tabata M, Nishi A et al. Proc 5th intl cong plant tissue and cell culture Tokyo, 1982: 399—400

4 Linsmaier E F, Skoog F. *Physiol Plant* 1965; 18: 100

5 Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant* 1962; 15: 473—497

6 Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. *Exp Cell Res* 1968; 50: 151—158

7 Fujita Y, Hara Y, Ogino T et al. *Plant Cell Reports* 1981; 1: 59—60

8 Morimoto I, Yoshimasa H. *Tetrahedron Letter* 1966; 31: 3677—3680

9 Papageorgiou Y P. *Plant Medica* 1979; 37(2): 185—187

10 Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. *Phytochemistry* 1977; 16(8): 1183—1186

11 Cheng Kuangchih, Liang Cheng. Proceedings of symposium on plant tissue culture. Peking: Science Press, 1978: 469—479